(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 373 676**

(51) Int. CI.:
A61L 15/22 (2006.01)
A61L 15/42 (2006.01)
A61L 15/28 (2006.01)
A61L 15/32 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **06256271 .5**
(96) Fecha de presentación: **08.12.2006**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1795210**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2007**

(54) Título: **VENDAJES PARA HERIDAS QUE COMPRENDEN CELULOSA OXIDADA Y COLÁGENO RECOMBINANTE HUMANO.**

(30) Prioridad:
09.12.2005 GB 0525130

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.02.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.02.2012

(73) Titular/es:
ETHICON, INC.
U.S. ROUTE 22
SOMERVILLE, NEW JERSEY 08876, US

(72) Inventor/es:
Boyle, Clare;
Silcock, Derek Walter y
Cullen, Breda Mary

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vendajes para heridas que comprenden celulosa oxidada y colágeno recombinante humano

La presente invención se refiere a composiciones para vendajes de heridas, que comprenden una celulosa oxidada y un colágeno recombinante humano y a los usos de los mismos para curar heridas.

La celulosa oxidada se produce mediante la oxidación de celulosa con, por ejemplo, peróxido de dinitrógeno. Este procedimiento convierte los grupos de alcohol primario sobre los residuos sacáridos en grupo de ácido carboxílico, formando residuos de ácido urónico en la cadena de celulosa. La oxidación no procede con selectividad completa y, como resultado, los grupos hidroxilo sobre los carbonos 2 y 3 se convierten, en ocasiones, en la forma ceto. Estas unidades de cetona introducen un enlace lábil de álcali, que, a pH 7 o superior, inicia la descomposición del polímero mediante la formación de una lactona y escisión del anillo de azúcar. Como resultado, la celulosa oxidada es biodegradable y bioabsorbible en condiciones fisiológicas.

La celulosa oxidada preferida para aplicaciones prácticas se oxida en celulosa oxidada regenerada (COR) preparada mediante la oxidación de una celulosa regenerada, tal como rayón. Durante algún tiempo se ha sabido que la COR tiene propiedades hemostáticas. La COR ha estado disponible como producto hemostático denominado SURGICEL (marca registrada de Johnson & Johnson Corporation) desde 1950. Este producto se produce mediante la oxidación de un material de rayón tejido.

Una modificación de la porosidad, la densidad y el patrón de tejido condujo al lanzamiento de un segundo producto textil de COR, INTERCEED (marca registrada Johnson & Johnson Corporation), que se ha demostrado que reduce la extensión de las adherencias posquirúrgicas en la cirugía abdominal.

El documento US-A-2517772 (Doub y col.) describe mejores materiales hemostáticos obtenidos impregnando la tela de COR con trombina.

El documento EP-A-0437095 describe un material de COR neutralizada preparado mediante el contacto de un material de COR ácido según se ha sintetizado con una solución de una sal básica de un ácido orgánico débil, tal como acetato sódico. El producto neutralizado resultante está indicado para la hemostasia y la prevención de las adherencias.

El documento EP-A-0562862 describe materiales de esponja bioabsorbible para usar como implantes para heridas. Los materiales comprenden una matriz de esponja de colágeno que tiene una subestructura orientada en su interior. La matriz y/o subestructuras pueden comprender celulosa oxidada regenerada. No existe una divulgación del uso de dichos materiales para el tratamiento de heridas crónicas.

El documento WO98/00180 describe el uso de esponjas liofilizadas de colágeno mezclado con celulosa oxidada regenerada (COR) para el tratamiento de heridas crónicas. El documento EP-A-1153622 describe además almohadillas de esponja estériles de este tipo basadas en mezclas de colágeno bovino/COR que exhiben reproducibilidad y resistencia a la tensión elevadas, tanto cuando están húmedas como cuando están secas. La almohadilla de esponja descrita en el documento EP-A-1153622 está liofilizada y al menos el 80 % en peso de la esponja consiste en una mezcla de colágeno bovino y celulosa oxidada regenerada en la proporción en peso de 60:40 a 40:60.

Las esponjas de colágeno bovino mezcladas con COR hechas de acuerdo con el documento EP-A-1153622 están disponibles comercialmente en Ethicon, Inc. como la marca registrada PROMOGRAN. Estos productos han tenido mucho éxito, especialmente para el tratamiento de heridas crónicas. Los materiales son de origen biológico natural (aunque químicamente modificados) y, en consecuencia, tienden a tener menor antigeneicidad. En general, los materiales son bioabsorbibles, lo que reduce los traumatismos asociados con la eliminación de los materiales de vendaje de heridas convencionales de la superficie de la herida. Además, algunos de estos materiales pueden tener efectos terapéuticos positivos sobre la cicatrización de heridas.

El documento GB-A-2408206 describe esponjas liofilizadas de colágeno mezclado con COR similares a las de los documentos WO98/00180 y EP-A-1153622, y que además comprende una sal de plata y un pigmento para fotoestabilizar la sal de plata. El colágeno es de origen bovino; no hay divulgación del uso de un colágeno recombinante en las composiciones. Los vendajes se describen como especialmente adecuados para el tratamiento de heridas crónicas y/o heridas infectadas.

David Olsen y col. en "Recombinant Collagen and Gelatin for Drug Delivery" Advanced Drug Delivery Reviews, Elsevier (Amsterdam), vo1.55, páginas 1547-1567 (2003) revisan el estado en la técnica de los colágenos recombinantes y su uso para fines biomédicos. El principal fin que se divulga es la liberación de fármacos. Además, se ha sugerido que el colágeno de tipo III recombinante puede proporcionar mejores propiedades hemostáticas cuando se incorporan en un vendaje para heridas.

Es un objeto de la presente invención para proporcionar mejores materiales para vendajes de heridas para heridas de mamífero y, especialmente, para heridas crónicas humanas, tales como úlceras venosas, úlceras por decúbito y

úlceras diabéticas. Dichas heridas crónicas exhiben, en general, poca o ninguna hemorragia o adherencias en otros tejidos del cuerpo.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición para vendaje de heridas que comprende un colágeno recombinante humano y una celulosa oxidada, en la que el colágeno recombinante humano se selecciona de colágeno recombinante humano de tipo I y colágeno recombinante humano de tipo III, y la proporción en peso entre el colágeno humano de tipo I y el colágeno humano de tipo III es mayor de 70:30.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un vendaje para heridas que comprende una composición para vendaje para heridas de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un uso de un vendaje para heridas que comprende una composición para vendaje para heridas de acuerdo con la invención, para la preparación de un vendaje para el tratamiento de una herida crónica.

Sorprendentemente se ha descubierto que el uso de colágeno recombinante humano en lugar de colágeno bovino en una esponja liofilizada hace que los fibroblastos dérmicos humanos proliferen en mayor grado que cuando se usa una esponja liofilizada que comprende colágeno bovino.

Preferentemente, la celulosa oxidada comprende celulosa oxidada regenerada (COR). La celulosa oxidada regenerada (COR) se puede obtener mediante el procedimiento descrito en el documento US-A-3122479. Este material ofrece numerosas ventajas, incluidas las características de que es biocompatible, biodegradable, no-inmunogénico y fácilmente disponible comercialmente. La COR está disponible con varios grados de oxidación y, por tanto, índices de degradación. La COR se puede usar en forma de fibras insolubles, incluidas telas de punto tejidas y no tejidas. En otras realizaciones, la COR está en forma de fragmentos hidrosolubles de bajo peso molecular obtenidos mediante hidrólisis alcalina de la COR.

En realizaciones preferidas, la celulosa oxidada está en forma de partículas, tales como partículas de fibra o partículas de polvo, preferentemente dispersas en un vehículo de medicamento tópico sólido o semisólido adecuado. En particular, los materiales contienen, preferentemente, fibras de COR, en las que una fracción de volumen de al menos 80 % de las fibras tiene longitudes en el intervalo de 20 μm a 1000 μm. Dicha distribución del tamaño se puede conseguir mediante, por ejemplo, molturación de un paño de COR, seguido de tamización del polvo molido para eliminar las fibras fuera del intervalo. Preferentemente, la longitud media (media en volumen) de las fibras de COR está en el intervalo de 250 μm a 450 μm. La selección de las longitudes de las fibras de COR en este intervalo tiene como resultado una fácil mezcla del COR y colágeno recombinante humano y productos altamente homogéneos. La COR forma complejos mejores con el colágeno recombinante humano, que tiene como resultado la potenciación de las propiedades terapéuticas de la esponja.

Preferentemente, la celulosa oxidada tiene un peso molecular medio superior a 50.000. Dicha celulosa oxidada es sustancialmente insoluble en los fluidos de la herida, pero sufrirán una degradación muy gradual en fragmentos bioreabsorbibles a pH fisiológico. Preferentemente, la celulosa oxidada no está neutralizada. No obstante, la presente invención abarca el uso de materiales parcial o completamente neutralizados, tal como se describen en el documento EP-A-0437095, para la preparación de medicamentos para el tratamiento de heridas crónicas como se ha definido anteriormente en el presente documento.

La expresión “colágeno recombinante humano” se refiere a colágeno fabricado cultivando un organismo no humano para expresar al menos un gen humano que codifica un colágeno. El colágeno recombinante humano se selecciona del grupo que consiste en colágeno de tipo I y de tipo III.

El colágeno recombinante humano se puede proporcionar mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la etapa de proporcionar colágeno recombinante humano puede comprender seguir el protocolo descrito en el documento US 5.962.648. Además, procedimientos recombinantes se exponen en los documentos US 5.593.859 y W02004/078120. Preferentemente, el colágeno se fabricará de forma recombinante cultivando una célula que se ha transfeccionado con al menos un gen que codifica el polipéptido que comprende colágeno y genes que codifican la CO y las subunidades de la enzima postraduccional prolil-4-hidroxilasa y purificando el monómero de colágeno resultante a partir de ellos. La solución de colágeno recombinante puede someterse después a condiciones de polimerización o de reticulación, para producir un colágeno fibroso insoluble.

El colágeno bovino es una mezcla de colágeno de tipo I (85%) y colágeno de tipo III (15%), una combinación que está en la naturaleza y no se puede variar. Una ventaja del colágeno recombinante es que el colágeno de tipo I y el colágeno de tipo III se pueden fabricar con independencia uno de otro, y, por tanto, se puede fabricar cualquier combinación de colágeno de tipo I y de tipo III. Los productos de acuerdo con la presente invención comprenden colágeno humano de tipo I y colágeno humano de tipo III en una proporción en peso de colágeno humano de tipo I:colágeno humano de tipo III superior a 70:30, por ejemplo aproximadamente 80:20.

Las composiciones de acuerdo con la presente invención comprenden, preferentemente, una mezcla estrecha del colágeno recombinante humano y la celulosa oxidada. Preferentemente, la mezcla estrecha comprende una solución o dispersión mixta del colágeno recombinante humano y la celulosa oxidada en un vehículo adecuado, tal como un

disolvente, o una composición sólida, producido eliminando el disolvente de dicha solución o dispersión. (Por dispersión se quiere decir una distribución de pequeñas partículas sólidas en el vehículo, por ejemplo una dispersión coloidal o dispersión formada mediante mezclado con cizalladura). Dicha mezcla estrecha tiene como resultado un complejo químico máximo entre los grupos de amina del colágeno recombinante humano y los grupos carboxilato sobre la celulosa oxidada. Todos los porcentajes y proporciones en el presente documento son porcentajes y proporciones en peso.

Preferentemente, el colágeno recombinante humano constituye al menos el 5 %, más preferentemente al menos el 10%, 20% o 30% en peso de la composición. Preferentemente, la celulosa oxidada también el constituye al menos el 5 %, más preferentemente al menos el 10%, 20% o 30% en peso de la composición. Preferentemente, el colágeno recombinante humano y la celulosa oxidada juntos constituyen al menos el 25 % en peso, más preferentemente el 50 % o 75 % en peso del material de vendaje para heridas y, en algunas realizaciones, al menos el 90 % en peso del material. En ciertas realizaciones preferidas, el material consiste esencialmente en el colágeno recombinante humano y celulosa oxidada.

Otros componentes del material de acuerdo con la invención pueden incluir 0-25 % en peso, por ejemplo de 1 a 20 % en peso, de uno o más polisacáridos biocompatibles, por ejemplo alginatos tales como alginato sódico o alginato cálcico, derivados de almidón, tal como glicolato almidón sódico, derivados de celulosa tales como celulosa de metilo o celulosa de carboximetilo, o glucosaminoglucanos, tales como ácido hialurónico o sus sales, sulfato de condroitina o sulfato de heparán. Los materiales de acuerdo con la presente invención también pueden comprender hasta el 25 % en peso, por ejemplo de 1 a 20 % en peso, de una o más proteínas estructurales adicionales seleccionadas del grupo que consiste en fibronectina, fibrita, laminita, elastina, colágenos distintos al colágeno recombinante humano, y mezclas de los mismos. Los materiales de acuerdo con la presente invención pueden también comprender hasta 20 % en peso, preferentemente de 2 % a 10 % en peso de agua. El materiales de acuerdo con la presente invención puede también contener 0-40 % en peso, por ejemplo de 5 a 25% en peso, de un plastificante, preferentemente un alcohol polihídrico tal como glicerol o sorbitol. En ciertas realizaciones, los materiales de acuerdo con la presente invención pueden también comprender hasta el 10 % en peso, por ejemplo de 0,01 a 5 % en peso, normalmente de 0,1 a 2 % en peso de uno o más agentes terapéuticos de cicatrización de heridas, tal como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (p. ej., acetaminófeno), esteroides, anestésicos locales, agentes antimicrobianos o factores de crecimiento (p. ej., factor de crecimiento de fibroblastos o factor de crecimiento derivado de las plaquetas). El agente antimicrobiano puede, por ejemplo, comprender un antiséptico, un antibiótico o mezclas de los mismos. Antibióticos preferidos incluyen tetraciclina, penicilinas, terramicinas, eritromicina, bacitracina, neomicina, polimicina B, mupirocina, clindamicina y mezclas de los mismos. Antisépticos preferidos incluyen plata, incluida plata coloidal, sales de plata, incluidas sales de uno o más de los polímeros aniónicos que forman el material, sulfadiazina de plata, clorhexidina, yoduro de povidona, triclosán, sales de amonio cuaternario y mezclas de los mismos. Estos materiales para vendajes medicados para heridas de acuerdo con la invención proporcionan una liberación sostenida de los agentes terapéuticos a medida que el material de vendaje para heridas se degrada con el uso.

Todos los porcentajes anteriores se expresan en peso seco.

Preferentemente, la proporción en peso entre el colágeno recombinante humano y la celulosa oxidada es de 1:99 a 99:1. Más preferentemente, la proporción en peso está en el intervalo de 1:9 a 9:1, más preferentemente está en el intervalo de 4:1 a 1:4, más preferentemente en el intervalo de 2:1 a 1:2; y más preferentemente, la proporción entre el colágeno recombinante humano y la celulosa oxidada es de 60:40 a 50:50. En ciertas realizaciones, el material consiste esencialmente ende aproximadamente 55 % en peso del colágeno recombinante humano y aproximadamente 45 % en peso de celulosa oxidada, en base al peso seco.

La composición de acuerdo de la presente invención puede estar en cualquier forma conveniente, tal como un polvo, microesferas, copos, una estera o una película.

En ciertas realizaciones, la composición de acuerdo de la presente invención está en forma de una pomada semisólida o en gel para aplicación tópica.

En ciertas realizaciones, la composición de acuerdo de la presente invención está en forma de una esponja bioabsorbible liofilizada o secada con disolvente para aplicación a una herida crónica. Preferentemente, el tamaño medio del poro de la esponja es de 10-500 μm, más preferentemente 100-300μm. Se ha fabricado una esponja adecuada liofilizando o secando con disolvente una dispersión acuosa que consiste esencialmente en partículas o fibras de colágeno recombinante humano y fibras e COR, junto con agentes terapéuticos adecuados.

Idóneamente, los materiales de acuerdo con la presente invención son esponjas liofilizadas de colágeno recombinante humano y COR sustancialmente como se ha descrito en el documento EP-A-1153622.

En otras realizaciones más, la composición de acuerdo de la presente invención está en forma de una película flexible, que puede ser continua o estar interrumpida (p. ej., perforada). Preferentemente, la película flexible comprende un plastificante para convertirla en flexible, tal como glicerol.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un vendaje para heridas que comprende una

composición para vendaje para heridas de acuerdo con el primer aspecto de la invención. El vendaje para heridas pueden consistir esencialmente en el material de vendaje para heridas de acuerdo con la invención, por ejemplo puede consistir en una lámina del material, en cuyo caso, normalmente, el vendaje se usaría junto con un vendaje secundario adecuado.

Preferentemente, el vendaje para heridas está en forma de lámina y comprende una capa activa de la composición de acuerdo con la invención. Normalmente, la capa activa sería la capa de contacto con la herida en uso, pero, en algunas realizaciones, podría estar separada de la herida por una lámina superior permeable a líquido. Preferentemente, el área de la capa activa es de aproximadamente 1 cm^2 a aproximadamente 400 cm^2, más preferentemente de aproximadamente 4 cm^2 a aproximadamente 100 cm^2.

Preferentemente, el artículo comprende además una lámina de refuerzo que se extiende sobre la capa activa en el lado opuesto al lado que mira hacia la herida de la capa activa. Preferentemente, la lámina de refuerzo es más grande que la capa activa, de modo que una región marginal de una anchura de 1 mm a 50 mm, preferentemente de 5 mm a 20 mm, se extiende alrededor de la capa activa para formar un vendaje denominado en isla. En estos casos, la lámina de refuerzo está cubierta, preferentemente, por un adhesivo de calidad médica sensible a la presión, al menos en su región marginal.

Preferentemente, la lámina de refuerzo es sustancialmente impermeable a líquidos. Preferentemente, la lámina de refuerzo es semipermeable. Es decir, preferentemente, la lámina de refuerzo es permeable al vapor de agua, pero no es permeable al agua líquida ni al exudado de las heridas. Preferentemente, la lámina de refuerzo es también impermeable a microorganismos.

Polímeros adecuados para formar la lámina de refuerzo incluyen poliuretanos y acrilatos de polialcoxialquilo y metacrilatos, tales como los divulgados en el documento GB-A-1280631. Preferentemente, la lámina de refuerzo comprende una capa continua de una espuma poliuretano bloqueado de alta densidad que, predominantemente, es de celdas cerradas. Un material adecuado para la lámina de refuerzo es la película de poliuretano disponible como la marca registrada ESTANE 5714F.

La capa adhesiva (cuando está presente) deberá transmitir vapor de humedad y/o tendrá un patrón para permitir el paso de vapor de agua a su través.

Preferentemente, la capa adhesiva es una capa adhesiva continua transmisora de vapor de agua, sensible al calor del tipo usado convencionalmente para los vendajes de heridas de tipo isla. Se prefieren los adhesivos sensibles a la presión basados en poliuretano.

El vendaje puede comprender además una capa absorbente entre la capa activa y la lámina protectora, especialmente si el vendaje es para uso con heridas con exudación. La capa absorbente opcional puede ser cualquiera de las capas usadas convencionalmente para absorber fluidos de heridas, suero o sangre en la técnica de la cicatrización de heridas, incluidas gasas, telas no tejidas, superabsorbentes, hidrogeles y mezclas de los mismos. Adecuadamente, la capa o capas absorbentes son sustancialmente coextensas con la capa de colágeno recombinante humano/COR.

La superficie del vendaje que mira a la herida puede estar protegida por una lámina cobertora extraíble. Normalmente, la lámina cobertora está formada por material termoplástico flexible. Materiales adecuados incluyen poliésteres y poliolefinas. Preferentemente, la superficie que mira al adhesivo de la lámina cobertora es una superficie extraíble. Es decir, una superficie que sólo es débilmente adherente a la capa activa y el adhesivo sobre la lámina de refuerzo para ayudar a la retirada de la lámina cobertora. Por ejemplo, la lámina cobertora puede estar formada por un plástico no adherente, tal como un fluoropolímero, o puede proporcionarse con un recubrimiento extraíble, tal como un recubrimiento extraíble de silicona o de fluoropolímero.

Preferentemente, el vendaje para heridas de la presente invención es estéril y está envasado en un contenedor impermeable a microorganismos.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de una composición de vendaje para heridas de acuerdo con el primer aspecto de la invención para la preparación de un vendaje para el tratamiento de una herida. Preferentemente, la herida es una herida crónica, por ejemplo, una herida seleccionada del grupo constituido por úlceras venosas, úlceras de decúbito y úlceras diabéticas.

Preferentemente, el vendaje se aplica a la herida crónica durante un periodo de al menos 1 hora, más preferentemente al menos 6 horas y más preferentemente al menos 12 horas. El tratamiento se puede prolongar durante varios días o semanas, con cambios de vendaje si es adecuado, en caso necesario para heridas crónicas. Esto contrasta con las aplicaciones hemostáticas de COR, que normalmente sólo duran unos segundos o minutos.

Se piensa que las composiciones de colágeno recombinante humano/celulosa oxidada estimulan la cicatrización de heridas crónicas de al menos uno los siguientes modos. En primer lugar, el complejo se une a factores de crecimiento, tales como PDGF, EGF y FGF, para retener estos factores de crecimiento en el lugar de la herida. De otro modo, dichos factores de crecimiento tienden a ser transportados lejos del lugar de la herida junto con el

exudado de la herida. La degradación gradual del colágeno recombinante humano/celulosa oxidada a pH fisiológico tiene como resultado la liberación gradual de los factores de crecimiento de nuevo en la herida. Un segundo motivo es que el material es completamente bioreabsorbible y fisiológicamente aceptable. Otro motivo es que los materiales estimulan la proliferación dérmica de fibroblastos. Un motivo adicional es que los materiales inactivan ciertas enzimas proteasas derivadas del huésped (matriz metaloproteinasas) que están presentes a niveles elevados en el fluido de heridas crónicas y que contribuyen a una mala cicatrización de heridas.

Los complejos de colágeno recombinante humano/celulosa oxidada usados en la presente invención pueden formarse mediante un procedimiento que comprende las etapas de: proporcionar una dispersión de un colágeno recombinante humano en un disolvente adecuado, preferentemente una dispersión acuosa; sumergir o dispersar la celulosa oxidada en el disolvente; seguido de la eliminación del disolvente de la dispersión para dejar un material sólido que comprende colágeno recombinante humano en complejo con celulosa oxidada.

La celulosa oxidada se puede añadir a la dispersión acuosa de colágeno recombinante humano en forma de una suspensión o solución de la celulosa oxidada, preferentemente a un pH comparable al de la suspensión de colágeno recombinante humano, seguido de mezclado mediante agitación u homogeneización. Como alternativa, las fibras o telas secas de celulosa oxidada se pueden dispersar o sumergir en la dispersión acuosa de colágeno recombinante humano.

Los componentes adicionales opcionales en los materiales de acuerdo con la invención están incluidos, preferentemente, en la dispersión antes de la retirada del disolvente de la dispersión.

Preferentemente, el pH de la dispersión se ajusta en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, preferentemente a un pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 8. La celulosa oxidada sufre hidrólisis hasta fragmentos solubles a un pH alto.

El disolvente se puede retirar de la dispersión mediante evaporación, por ejemplo mediante evaporación de la dispersión en una bandeja para dejar una película de material. En otras realizaciones, el disolvente, preferentemente agua, se retira mediante desecación por congelación (liofilización) o desecación con disolvente para producir el material en forma de una esponja. Preferentemente, la dispersión del disolvente contiene 5-20 mg/ml de colágeno recombinante humano.

En ciertas realizaciones, el procedimiento puede comprender además tratar el colágeno recombinante humano y/o la celulosa oxidada en la dispersión o en el material seco, con un agente de reticulación tal como epiclorhidrina, carbodiimida, diisocianato de hexametileno (HMDI) o glutaraldehído.

Como alternativa, la reticulación se puede llevar a cabo en condiciones de deshidrotermia. El procedimiento de reticulación puede afectar marcadamente al producto final. Por ejemplo, el HMDI reticula los grupos amino primarios sobre el colágeno recombinante humano dentro del complejo, mientras que la carbodiimida reticular hidratos de carbono en la COR con los grupos amino primarios sobre el colágeno recombinante humano.

Se apreciará que cualquier característica adicional o alternativa que se han descrito anteriormente en relación con uno cualquiera de los aspectos de la invención son también características alternativas o adicionales en relación con cualquier otro aspecto de la invención, solas o en combinación.

A continuación se describirán adicionalmente realizaciones específicas de la presente invención a modo de ejemplo.

Ejemplo de referencia 1: Preparación de una esponja de colágeno bovino/COR fibrosa

Una esponja de colágeno liofilizado/COR se prepara del siguiente modo.

En primer lugar, el componente de colágeno se prepara a partir de dermis bovina, del siguiente modo. La dermis bovina se extrae de la piel de vaca, se raspa y empapa de una solución de hipoclorito sódico (0,03 % p/v) para inhibir la actividad microbiana pendiente de procesamiento adicional. Después, la dermis se lava con agua y se trata con una solución que contiene hidróxido sódico (0,2 % p/v) y peróxido de hidrógeno (0,02 % p/v) para inflar y esterilizar la piel a temperatura ambiente. A continuación, se somete a los fragmentos de dermis a una etapa de tratamiento alcalino en una solución que contiene hidróxido sódico, hidróxido cálcico y bicarbonato sódico (0,4 % p/v, 0,6 % p/v y 0,05 % p/v, respectivamente) a un pH superior a 12,2, a temperatura ambiente y durante un tiempo de 10-14 días, con agitación, hasta alcanzar niveles de nitrógeno de amida inferiores a 0,24 mmol/g. Después, se somete a los fragmentos de dermis a una etapa de tratamiento ácido con 1 % de ácido clorhídrico a temperatura ambiente y a un pH 0,8-1,2. El tratamiento continúa con rotación hasta que los fragmentos de dermis han absorbido suficiente ácido para alcanzar un pH inferior a 2,5. Después, los fragmentos se lavan con agua hasta que el valor de pH de los fragmentos de dermis alcanza 3,0-3,4. A continuación, los fragmentos de dermis se trituran con hielo en un triturador de cuenco primero con una trituración gruesa y, después, en un contexto de trituración fina. La pasta resultante, que está hecha de una proporción de 650 g de fragmentos de dermis a 100 g de agua, en forma de hielo, se congela y almacena antes de usar en la siguiente etapa del procedimiento. No obstante, el colágeno no se liofiliza antes de mezclar con la COR en la siguiente etapa.

El componente COR de la almohadilla liofilizada se prepara del siguiente modo. Un paño de SURGICEL (Johnson & Johnson Medical, Arlington) se moltura usando una cuchilla rotatoria a través de una placa de malla, manteniendo la temperatura por debajo de 60 ºC.

El polvo de COR molida y el peso requerido (de acuerdo con el contenido en sólidos) de pasta de colágeno congelado se añaden después a una cantidad suficiente de agua acidificada con ácido acético, para obtener un valor de pH de 3,0 y un contenido en sólidos totales del 1,0 %. La mezcla se homogeneiza a través de un homogeneizador Fryma MZ130D, disminuyendo progresivamente los parámetros para formar una suspensión espesa homogénea. El pH de la suspensión espesa se mantiene a 2,9-3,1. La temperatura de la suspensión espesa se mantiene por debajo de 20 ºC y el contenido en sólidos se mantiene a 1 % ± 0,07.

La suspensión espesa resultante se bombea a un vaso de desgasificación. Se inicia el vacío durante un mínimo de 30 minutos, con agitación intermitente, para desgasificar la suspensión espesa. Después, la suspensión espesa se bombea en bandejas del liofilizador hasta un espesor de 25 mm- Las bandejas se colocan en los estantes del congelador en los que se ha prefijado una temperatura de -40 ºC. Después se inicia el programa de liofilización para secar y reticular deshidrotérmicamente el colágeno y la OCR para formar almohadillas de esponja gruesas. Al finalizar el ciclo, se libera el vacío, se retiran los bloques liofilizados y, después, se dividen para retirar las capas de las superficies superior e inferior, y para dividir el resto de los bloques en almohadillas de 3 mm de espesor. La etapa de dividir los bloques liofilizados en almohadillas se lleva a cabo con una cortadora Fecken Kirfel K1. Por último, las almohadillas se cortan con troquel al tamaño y forma deseados en un troquelador, se envasan y esterilizan con 18-29 KGy de radiación gamma con cobalto 60. Sorprendentemente, esta radiación no produce desnaturalización significativa del colágeno, que parece estar estabilizado por la presencia de COR. Las almohadillas de colágeno-COR liofilizado tienen un aspecto uniforme blanco aterciopelado. El espesor de las almohadillas es 3,2 ± 0,17 mm (N= 8 lotes). Estas almohadillas se usan como control positivo en los Procedimientos que de describen más adelante.

Ejemplo 1: Preparación de una esponja de colágeno recombinante humano/COR fibrosa

Las esponjas de colágeno recombinante humano/COR fibrosa se prepararon como se describe en el Ejemplo de referencia 1, pero con sustitución del colágeno por una fracción de igual peso de colágeno recombinante humano. El colágeno recombinante humano se adquirió en Fibrogen Inc., 225 Gateway Boulevard, South San Francisco, California, 94080. El colágeno se produjo a partir de levadura genéticamente modificada y se reticuló para conseguir una consistencia comparable a la del material bovino. El colágeno recombinante humano era igual que el colágeno bovino en cuanto a su susceptibilidad a la digestión con tripsina. Se preparó una serie de esponjas diferentes con proporciones variables entre colágeno recombinante de tipo I y colágeno recombinante de tipo III.

Procedimiento 1: Ensayo de proliferación de fibroblastos dérmicos humanos

El ensayo de proliferación de fibroblastos dérmicos humanos se llevó a cabo del siguiente modo.

Los extractos prototipo se prepararon del siguiente modo – 1 mg de cada material para vendaje de heridas que se va a someter a ensayo se introdujo en 1 ml de medio sin suero y se incubó durante 24 horas a 37 ºC en condiciones estériles.

Fibroblastos dérmicos humanos adultos se cultivaron y mantuvieron en DMEM con 10 % de FBS (medio de cultivo estándar; medio mínimo esencia de Dulbecco; suero bovino fetal). Estas células se subcultivaron rutinariamente y se usaron para ensayos experimentales cuando alcanzaron un 95 % de confluencia. Los fibroblastos dérmicos humanos adultos se recogieron en una confluencia del 95 % y se volvieron a sembrar en una placa de microtitulación de 96 pocillos (100 ml/pocillo) en DMEM + 10% de FBS a una densidad celular de 2,5 x 10^4 células/ml. Las células se dejaron adherir a la superficie de la placa durante 24 horas en un incubador humidificado a 37 ºC, 5 % de CO_2. Después, se retiró el medio mediante aspiración y la monocapa celular se lavó con DMEM sin suero.

Las muestras de ensayo (extractos de cada prototipo) se añadieron después a la monocapa celular (100 ml/pocillo). Se midieron seis duplicados de cada muestra de ensayo. Todas las muestras se incubaron con las células durante 48 horas a 37 ºC, 5 % de CO2. Después de este periodo de incubación se retiró el medio acondicionado mediante aspiración y se sustituyó con una solución de marcaje de un kit de proliferación celular comercial (XTT, Cell Proliferation kit II, nº de cat. 1 465 015, obtenido de Boehringer Mannheim). Una vez añadida esta solución se obtuvo una lectura de la absorbancia inicial a 450 nm, tras lo cual se incubó la placa de microtitulación a 37 ºC, 5 % de CO_2 y la absorbancia se monitorizó en 4 horas. Las mediciones de la absorbancia se llevaron a cabo en un aparato Thermolabsystems Multiskan Spectrum.

El efecto proliferativo de cada prototipo se evaluó comparando las lecturas de absorbancia medidas frente a los controles positivos y negativos. El medio de crecimiento que contiene suero (10 % de FBS en DMEM) se usó como control positivo y el medio sin suero se usó como control negativo. Los resultados se muestran en la Tabla 1. El efecto medido sobre el crecimiento de fibroblastos dérmicos humanos se representa como un porcentaje del incremento de la proliferación celular entre el control negativo (a 0 %) y el control positivo (a 100 %).

Tabla 1

Muestra	100 % de tipo I 0 % de tipo III	0 % de tipo I* 100 % de tipo III	80 % de tipo I 20 % de tipo III	60 % de tipo I* 40 % de tipo III	40 % de tipo I 60 % de tipo III	20 % de tipo I 80 % de tipo III*	Ejemplo de referencia 1*
Media	91,4	55,1	71,4	77,8	74,7	64,0	20
Desviación estándar	13,7	16,5	8,8	14,4	20,5	26,1	5,4
Ejemplo de referencia*							

Por tanto, se puede ver que el Ejemplo de Referencia 1 exhibe un pequeño incremento de la proliferación de fibroblastos sobre el control negativo, pero el incremento es de sólo el 20 % del incremento que se consigue mediante el control positivo. En contraste con ello, las composiciones que comprenden colágeno recombinante humano alcanzan de 55,1 % a 91,4 % del incremento en la proliferación de fibroblastos alcanzada por el control positivo.

Los datos de proliferación celular presentados en la Tabla 1 muestran que todas las formulaciones recombinantes humanas fueron mejores que el colágeno bovino equivalente del Ejemplo de Referencia 1.

Procedimiento 2: Inhibición de la matriz metaloproteinasa

Muestras congeladas del fluido de herida de seis pacientes diferentes se descongelaron y diluyeron según lo adecuado.

Las muestras de vendajes para heridas eran muestras para biopsia por punción de 6 mm de diámetro tomadas de los materiales de lámina liofilizada. En los procedimientos de ensayo siguientes, una muestra de esponja de colágeno/COR preparada como se ha descrito en el Ejemplo de Referencia 1 se usó como control positivo. Como control negativo se usó una muestra de gasa SOF-WICK (marca registrada).

Las muestras de vendaje se empaparon previamente durante unos segundos en solución salina tamponada con fosfato (PBS), eliminándose el exceso mediante una ligera presión antes de añadir las muestras de vendaje a las respectivas muestras de fluidos de heridas. Los fluidos de heridas se incubaron con las muestras para vendaje a 37 ºC. Las muestras de los fluidos de herida incubados se tomaron a los puntos de tiempo T= 30 minutos y T= 60 minutos.

Los niveles de actividad de las matriz metaloproteinasas presentes en las muestras de fluidos de heridas se midieron mediante espectrofluorometrías usando ensayos de actividad del sustrato. Los sustratos comprenden péptidos cortos sintetizados para simular el sitio de escisión enzimático adecuado y contienen un grupo indicador fluorescente que se libera tras la hidrólisis. La actividad enzimática se determinó midiendo la tasa de producción del compuesto fluorimétrico, 7-amino-4-metil-coumarina. La actividad se expresó en forma de unidades de fluorescencia relativa por minuto (UFR/min). Cada muestra se analizó 6 veces y se calculó el valor promedio. El sustrato se preparó a una concentración madre 10 mM y se diluyó a una concentración de trabajo de 0,5 mM en el tampón de ensayo adecuado. La mezcla de reacción, combinada en un pocillo de microtitulación (negro, de fondo plano), comprendía 5 µl de fluido de herida, 175 µl de tampón de ensayo y 20 µl de sustrato (concentración final 50 µM). La placa de microtitulación se leyó inmediatamente a 455 nm (excitación 383 nm) y a intervalos cronometrados en la hora siguiente; entre lecturas, la placa se cubrió e incubó a 37 ºC. La actividad de tipo matriz metaloproteinasa se estimó usando el sustrato succinil-glicina-prolina-leucina-glicina-prolina 7-amino-4-metil-coumarina (Bachem, UK, Ltd.) solubilizado en metanol. El tampón de ensayo necesario para la actividad máxima de MMP fue Tris/HCl 40 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 200 mm y $CaCl_2$ 10 mM. Las mediciones de la fluorescencia se llevaron a cabo en un aparato Dynex Technologies Fluorolite 1000.

Los resultados se muestran en la Tabla 2 (para T= 30 minutos) y la Tabla 3 (para T= 60 minutos). Las tablas muestran las actividades de MMP medidas en UFR/min para las seis muestras de fluido de heridas (filas 1 a 6 de las tablas, respectivamente, los valores medios en UFR/min (fila 7) y el porcentaje de actividad restante de MMP (fila 8).

Sólo se observaron pequeñas variaciones en la inhibición de la MMP para las diferentes formulaciones que comprenden colágeno humano recombinante. No obstante, la formulación de 80:20 de humano tipo I:tipo III era mejor que las otras. La inhibición de las MMP por los materiales de acuerdo con la invención fue, aparentemente, ligeramente menor que la inhibición obtenida para el material del Ejemplo de Referencia 1 (que comprende colágeno bovino), pero la diferencia no se considera significativa.

Tabla 2

* 100 % de tipo III 0 % de tipo I	* 80 % de tipo III 20 % de tipo I	* 60 % de tipo III 40 % de tipo I	* 40 % de tipo III 60 % de tipo I	* 20 % de tipo III 80 % de tipo I	0 % de tipo III 100 % de tipo I	* Ejemplo de referencia 1	* Control
0,542	0,835	0,56	0,626	0,141	0,52	0,182	1,624
1,036	0,735	0,723	0,683	0,452	0,674	0,266	1,824
0,553	0,824	0,664	0,723	0,334	0,615	0,222	1,817
0,501	0,655	0,8	0,599	0,495	0,577	0,409	1,777
0,786	0,824	0,664	0,723	0,334	0,615	0,222	1,817
0,591	0,687	0,615	0,626	0,581	0,607	0,252	1,81
UFR/min							
0,668	0,760	0,671	0,663	0,390	0,601	0,259	1,778
%							
37,6	42,7	37,7	37,3	21,9	33,8	14,6	100,0
*Ejemplo de referencia							

Tabla 3

* 100 % de tipo III 0 % de tipo I	* 80 % de tipo III 20 % de tipo I	* 60 % de tipo III 40 % de tipo I	* 40 % de tipo III 60 % de tipo I	* 20 % de tipo III 80 % de tipo I	0 % de tipo III 100 % de tipo I	* Ejemplo de referencia 1	* Control
0,087	0,38	0,233	0,047	0	0,127	0	0,733
	0,36	0,18	0,04	0	0,213	0,007	1,367
0,033	0,007	0,193	0,193	0	0,153	0	1,4
0,06	0	0,28	0,347	0,027	0,34	0	1,553
0,207	0,38	0,147	0,313	0,333	0,173	0,04	1,42
0,067	0,4	0,033	0,28	0,047	0,233	0	1,033
UFR/min							
0,096	0,255	0,178	0,203	0,068	0,207	0,008	1,251
%							
7,6	20,3	14,2	16,3	5,4	16,5	0,6	100,0
*Ejemplo de referencia							

REIVINDICACIONES

1. Una composición para vendaje para heridas, que comprende un colágeno recombinante humano y una celulosa oxidada, en la que el colágeno recombinante humano se selecciona de colágeno recombinante humano de tipo I y colágeno recombinante humano de tipo III, y la proporción en peso entre el colágeno humano de tipo I y el colágeno humano de tipo III es mayor de 70:30.

2. Una composición para vendaje para heridas de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el colágeno recombinante humano y la celulosa oxidada están en forma de una dispersión mixta o solución en un disolvente o en forma de una composición sólida obtenible eliminando el disolvente de dicha solución o dispersión.

3. Una composición para vendaje para heridas de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que dicha celulosa oxidada está en forma de fibras dispersas o polvo.

4. Una composición para vendaje para heridas de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que la celulosa oxidada comprende celulosa oxidada regenerada (COR).

5. Una composición para vendaje para heridas de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que la proporción en peso del colágeno humano de tipo I y el colágeno humano de tipo III es de 80:20.

6. Una composición para vendaje para heridas de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que la celulosa oxidada y el colágeno recombinante humano juntos constituyen al menos un 25 % en peso del material en peso seco.

7. Una composición para vendaje para heridas de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la celulosa oxidada y el colágeno recombinante humano juntos constituyen al menos un 50% en peso del material en peso seco.

8. Una composición para vendaje para heridas de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que la celulosa comprende además de 0,01 a 5 % en peso en peso seco de una o más sustancias terapéuticas de cicatrización de heridas.

9. Una composición para vendaje para heridas de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en la que la proporción en peso del colágeno humano y la celulosa oxidada en la composición es de 1:10 a 10:1.

10. Una composición para vendaje para heridas de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la proporción en peso del colágeno recombinante humano y la celulosa oxidada está en el intervalo de 1:4 a 4:1.

11. Un vendaje para heridas que comprende una composición para vendaje para heridas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Un vendaje para heridas de acuerdo con la reivindicación 11, que es estéril y está envasado en un contenedor impermeable a microorganismos.

13. Uso de una composición para vendaje para heridas de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para la preparación de un vendaje para el tratamiento de una herida.

14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la herida es una herida crónica.

15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el que la herida crónica se selecciona del grupo que consiste en úlceras venosas, úlceras de decúbito y úlceras diabéticas.